

Versuche zur Isolierung von Eiweißantigenen aus dem Zellinhalt von *Candida albicans*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gunter Stolzenbach
aus Hamburg

Marburg 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554427_0020

Versuche zur Isolierung von Eiweißantigenen aus dem Zellinhalt von *Candida albicans*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gunter Stolzenbach
aus Hamburg

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg/Lahn am 14.12.67.

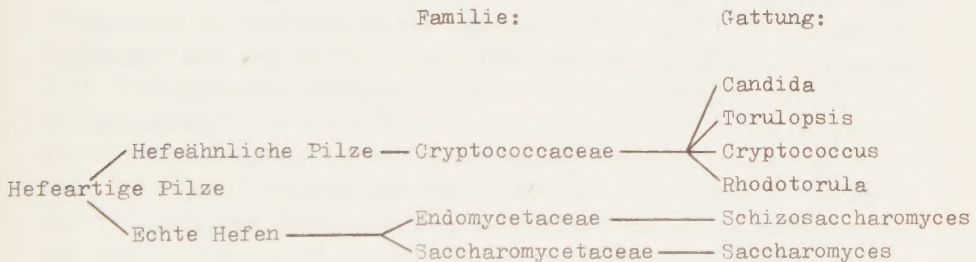
Dekan:	Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent:	Prof. Dr. med. R. Siegert, Hygiene-Institut der Universität
Correferent:	Doz. Dr. med. W. Schiff, Hygiene-Institut der Universität.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	4
I. Hefestämme	4
II. Züchtung	5
III. Antigenherstellung	5
a. Homogenisieren der Zellen	5
b. Gewinnung von Zellinhalt	5
IV. Präparative Trägerelektrophorese	6
V. Säulenchromatographie	7
a. Ionenaustauschchromatographie	8
b. Gel-Filtration	9
VI. Gewinnung von Immunseren	11
VII. Immunoelktrophorese	11
C. <u>Ergebnisse</u>	13
I. Antigenisolierung	13
a. Präparative Trägerelektrophorese	13
b. Ionenaustauschchromatographie	13
c. Fraktionierte Ammonsulfatfällung	16
d. Gel-Filtration	20
II. Gewinnung von Immunseren	24
III. Immunoelktrophoretische Kreuzreaktionen	25
D. <u>Besprechung</u>	27
E. <u>Zusammenfassung</u>	29
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	30

A. Einleitung:

Als "Hefen" bezeichnete man ursprünglich nur solche Pilze, welche in flüssigen Medien Gär Schaum oder Bodensatz bildeten. Später erhielten weitere Merkmale, wie beispielsweise die Askosporenbildung, das Auftreten von Sproßzellen oder Myzel und die Hautbildung auf Flüssigkeiten, zunehmende Bedeutung. Ein nach 1900 von HANSEN (7), GUILLIERMOND (6) und JANKE (10) aufgestelltes System der Hefen hatte diese Merkmale zur Grundlage, deren Ermittlung in den Jahren 1934 - 52 von dem Arbeitskreis um KLUYVER (12) verfeinert und verbessert wurde. Auf GÄUMANN (3) geht ein "System der hefeartigen Pilze" zurück, wie es im folgenden gekürzt wiedergegeben wird:



Diesem System liegen entwicklungsgeschichtliche Kriterien zugrunde, wobei die Bezeichnungen "hefeartige Pilze" und "hefeähnliche Pilze" nach einem Vorschlag von HANSEN und LUND (11) gewählt wurden. Die Hinzunahme morphologischer und physiologischer Kriterien führte zu einem recht komplizierten Bestimmungsschlüssel für die Arten der hefeartigen Pilze, nach dem heute verfahren wird. Er beruht auf der gleichwertigen Verwendung möglichst vieler Merkmale, wie es besonders WINDISCH (23) mit Nachdruck fordert. Die Bestimmung bedeutet daher einen erheblichen Aufwand an Zeit und Material und ist trotz allem immer noch nicht zufriedenstellend und zwar sowohl im Hinblick auf die Abgrenzung der "hefeartigen Pilze" gegenüber anderen

Mikroorganismen, als auch untereinander.

Die Schwierigkeit besteht zum Beispiel für die e n t w i c k -
l u n g s g e s c h i c h t l i c h orientierte Systematik
nach WINDISCH darin, daß immer wieder Abweichungen von den
einmal erkannten Entwicklungsgängen gefunden werden. In den
letzten Jahren konnten einige Candidaarten, bei denen ge-
schlechtliche Sporen zuvor unbekannt waren, als imperfekte
Formen von Saccharomycesarten erkannt werden. So ist Candida
robusta beispielsweise als das imperfekte Stadium von
Saccharomyces cerevisiae anzusehen (23) und demzufolge das von
GÄUMANN aufgestellte System nicht aufrechtzuerhalten.

Auch die morphologischen und physiologischen Eigenschaften
vieler Hefen zeigen eine große Variabilität. Die M o r p h o -
l o g i e erfährt insbesondere durch äußere Einflüsse tief-
greifende Änderungen, weshalb zum Beispiel LODDER (13),
WICKERHAM (22) u.a. die Verwendung des Formbildes der Riesen-
kolonie bei Hefen als Merkmal ablehnen. WICKERHAM und SKINNER
(20) halten aufgrund eigener Untersuchungen an Pseudomyzel
bildenden Hefen die p h y s i o l o g i s c h e n Merkmale
(Gär- und Assimilationseigenschaften) für kennzeichnender.
WINDISCH betont jedoch, daß über die Verwendbarkeit der
Assimilation einzelner Stoffe als Artkennzeichen keinerlei
nähere Angaben vorliegen.

So ist also die Artenbestimmung bis heute ein mit vielen Un-
sicherheitsfaktoren belastetes Verfahren, das nicht frei von
persönlichen Ansichten wie Prioritätsansprüchen ist und daher
zum Teil eine Ermessensfrage darstellt. Es erschien deshalb
zweckmäßig, das Kriterium der unterschiedlichen A n t i g e n -
s t r u k t u r für die Artenbestimmung heranzuziehen, was
zuerst TSUCHIYA (21) in den Jahren 1955-65 unter Verwendung
einer größeren Zahl von Hefen tat.

Untersuchungen von MÜLLER und Mitarb. (19, 14, 15) ergaben,
daß Komplementbindungsreaktionen, Agar-Gel-Präzipitationsteste
und Zellagglutinationen zum Nachweis feiner Antigendifferenzen

zu unempfindlich sind, da hierbei differente Antigene durch eine Summe von nahe verwandten oder sogar identischen Antigenen vollständig überdeckt werden können. Dagegen war es mit Hilfe der Immunoelktrophorese möglich, nach Absorption von Immunseren mit sensibilisierten Erythrocyten oder mit intakten Hefezellen, Differenzen zwischen Polysaccharidantigenen, beispielsweise von *Candida albicans* und *Candida tropicalis*, nachzuweisen. Immunoelktrophoretische Untersuchungen, die bei pH 8,2 mit homogenisierten Zellen und gegen sie gerichteten Immunseren durchgeführt wurden, ließen auf der Anodenseite eine Vielzahl feiner, scharfer Präzipitatlinien erkennen, dagegen fanden sich auf der Kathodenseite stärkere, meist weniger gut auflösbare Linien. Während sich *C. albicans* und *tropicalis* in ihren kathodenwärts wandernden Antigenen nur wenig unterschieden, zeigten vergleichende immunoelktrophoretische Untersuchungen auffallende Differenzen zwischen den anodenseitigen Immunpräzipitationen, für deren Entstehung Eiweißantigene verantwortlich sind, welche bisher nur in den Antigeneschemata von BIGUET (1) berücksichtigt wurden. Vergleichende immunoelktrophoretische Untersuchungen ermöglichen zwar durchaus die Erkennung von Unterschieden, lassen aber wegen der Vielzahl von Präzipitatlinien und aufgrund der Tatsache, daß beim Immunisieren mit den gesamten Antigenen außerordentlich unterschiedliche Immunseren von Kaninchen gebildet werden, keine exakte Differenzierung zu. Da jedoch vor allem das Antigenmuster der Eiweißkörper für die Artkennzeichnung bedeutsam zu sein scheint, wird in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, aus Zellinhaltsmaterial von *C. albicans* bei pH 8,2 anodenwärts wandernde Antigene zu isolieren und gegen sie gerichtetes Immunserum zu gewinnen, um damit andere Hefearten auf das Vorhandensein einer Antigengemeinschaft zu prüfen.

B. Material und Methoden:

I. Hefestämme:

Folgende, nach morphologischen und physiologischen Merkmalen bestimmte Arten fanden Verwendung und zwar *C. albicans* CBS 256 für die Antigenisolierung, die übrigen Stämme als Zellhomogenisate für die Kreuzreaktionen:

Stämme:	Herkunft:
<i>Candida albicans</i> 256	CBS*
<i>Candida albicans</i> A 3153	London
<i>Candida albicans</i> B 3156	London
<i>Candida tropicalis</i> 94	CBS
<i>Candida pseudotropicalis</i> 607	CBS
<i>Candida utilis</i> 040	CBS
<i>Candida stellatoidea</i> 1905	CBS
<i>Candida humicola</i> syn. <i>curvata</i>	CBS
<i>Candida curvata</i>	S**
<i>Candida krusei</i> 573	CBS
<i>Candida guilliermondii</i>	S
<i>Candida reukauffii</i>	S
<i>Candida parapsilosis</i>	M***
<i>Candida brumptii</i>	S
<i>Candida lipolytica</i>	S
<i>Candida macedoniensis</i>	S
<i>Torulopsis Dattila</i>	M
<i>Torulopsis glabrata</i>	S
<i>Torulopsis famata</i>	S
<i>Torulopsis inconspicua</i>	S
<i>Cryptococcus neoformans</i>	S
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	M
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	Heidelberg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1172	CBS
<i>Saccharomyces rouxii</i> 732	CBS

* Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Julianalaan 67a

** Sammlung Prof. Seeliger, Würzburg

*** Sammlung Dr. Meinhof, Dermatol. Univ.-Klinik, Marburg

II. Züchtung:

Die auf Sabouraud-Maltose-Agar (65g Trockensubstanz Difco* in 1000 ml aqua dest.) in Rouxflaschen ausgeimpften Stämme wurden 48 Std. bei 30° C bebrütet. Die zu einem dichten Rasen herangewachsenen Zellen ließen sich mit steriler physiologischer Kochsalzlösung abschwemmen und 10 Min. bei 3000UpM in der Christ-Zentrifuge abschleudern. Das dreimal mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Sediment kam als 50Vol.-%ige Zellsuspension zur weiteren Aufbereitung.

III. Antigenherstellung:

a. Homogenisieren der Zellen:

Zur mechanischen Zerstörung der Zellmembranen diente der Zellhomogenisator Modell MSK**:

Die 50Vol.-%ig suspendierten Zellen wurden in einer zur Hälfte mit Glasperlen (Durchmesser 0,5mm) gefüllten Schüttelflasche innerhalb eines federnd aufgehängten Stahlrohres dadurch aufgeschlossen, daß dessen Längsachse mit 4000/Min. 3 1/2 Min. lang eine kreisförmige Bewegung beschrieb. Durch Kühlung mit flüssigem Kohlendioxyd blieb die Temperatur des Schüttelgutes unterhalb 15°C. Alle Zellmembranen platzten, so daß der Zellinhalt austreten konnte. Das so entstandene Homogenisat von *C. albicans* CBS 256 diente der Gewinnung von Immunseren, das der übrigen Hefen der Durchführung von Kreuzreaktionen.

b. Gewinnung von Zellinhalt:

Das Homogenisat von *C. albicans* CBS 256 wurde von den Glasperlen abpipettiert, nachdem diese mit steriler physiologischer Kochsalzlösung bis zu einem Gesamtvolumen von etwa 100ml gewaschen waren. Anschließend sedimentierten die Membranen in der Zentrifuge 10 Min. lang bei 3000UpM und trennten sich so vom Überstehenden Zellinhalt. Ergab die mikroskopische Untersuchung, daß keine Zellmembranen mehr vorhanden waren, so ließ er sich zur Antigenisolierung verwenden.

* Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

** Fa. B. Braun, Melsungen, Apparatebau

IV. Präparative Trägererelektrophorese:

1. Pufferlösung:

Der Diaethylbarbitursäure-Acetat-Puffer der Ionenstärke 0,1 nach Michaelis (Veronalpuffer) entstand auf folgende Weise: 9,81g Natrium-diaethylbarbiturat und 6,40g Natriumacetat trihydrat wurden in 1000ml aqua dest. gelöst und mit 1N HCl auf pH 8,2 eingestellt.

2. Trägermedien und ihre Bereitung:

Als Trägermaterialien fanden Verwendung:

1) Perlpolymerisiertes Sephadex* (quervernetztes Dextran) des Typs G-50 Fine, sowie

2) Geon X-427** (gepulvertes Polyvinylchlorid).

In Veronalpuffer (pH 8,2) aufgeschwemmtes Sephadex-Trockengel wurde unter Vakuum entgast, während 24 Std. zehnmal dekantiert und mit Veronalpuffer erneut suspendiert. Geon X-427 ist in aqua dest. mehrmals aufgeschwemmt, und das Wasser zur Beseitigung kleinerer Partikel dekantiert worden. Schließlich wurde eine Suspension in Veronalpuffer (pH 8,2) hergestellt, und der Schaum, der sich beim Rühren gebildet hatte, an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Aus dem in gerade noch gießbarer Suspension befindlichen Träger ließ sich ein Block auf folgende Weise herstellen:

3. Gießen der Trägerblocks:

In einem auf einer Kunststoffolie*** liegenden Plexiglasrahmen wurde ein 46cm langer, 15 cm breiter und 0,6cm hoher Trägerblock gegossen, und die überschüssige Pufferlösung außerhalb des Rahmens mittels Filterpapier ständig abgesaugt. Der Block war je nach Trägertyp nach 2-5 Stunden stabil, so daß der Rahmen entfernt werden konnte.

4. Einbringen der Analysenlösung:

In der Mitte des Blocks ließ sich - senkrecht zur Wanderungsrichtung - ein 10cm langer und 1 cm breiter Graben

* Deutsche Pharmacia G.m.b.H., 6 Frankfurt/M.1, Inckusstr.11

** Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg, Römerstr.118

*** Hostaphan Versuchsfolie 56. Fa. Kalle und Co. Wiesbaden

mit einem geeigneten Spatel ausheben. Bis zu 5ml der gegen Veronalpuffer (pH 8,2) dialysierten und mit trockenem Trägermaterial zu einer streichfähigen Masse verrührten Analysenlösung konnten in den Graben eingebracht werden.

5. Hochspannungselektrophorese:

Der so präparierte Trägerblock mußte mit seiner Folie blasenfrei auf die angefeuchtete Arbeitsplatte des Pherographen* aufgelegt werden. Als Stromzuleitungen dienten je vier Lagen eines 15cm breiten Filterpapiers**, die in tütenartig gefaltete Cellophanhüllen eingeschlagen wurden. Auf den Trägerblock kam die verschlossene Kante der mit Puffer getränkten Zuleitung zu liegen, die offene Kante tauchte in die Pufferwanne ein. Schließlich ließ sich durch Aufsetzen einer mit Gummirahmen versehenen Glasplatte eine feuchte Kammer erzeugen. Für die Dauer von 10 Min., 30 Min., 1 Std., 3 Std. und 6 Std. wurde die Spannung 1000 Volt angelegt, was einer Feldstärke von etwa 20 Volt/cm entsprach. Dabei floß durch die Gelblocks ein Strom der Stärke 150mA und belastete den Trägerblock mit 150 Watt. Bei Verwendung des Polyvinylchloridblocks betrug die Stromstärke 50mA und führte zu einer Trägerbelastung von 50 Watt. Während der Trennung wurde die Arbeitsplatte auf 4° C gekühlt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Trägerblock parallel zum Graben in schmale Streifen aufgeteilt, das Trägermaterial herausgenommen und mit aqua dest. eluiert.

V. Säulenchromatographie:

Das Sammeln und Registrieren der Eluatfraktionen besorgte ein Fraktionssammler mit Durchflußphotometer und gekoppeltem Elektronenschreiber***. Das Durchflußphotometer**** ermöglichte während der chromatographischen Trennung die Lokalisation von

* Hochspannungselektrophorese-Apparatur. Fa. Hölzel, München 2

** MN 2214 ff. Fa. Macherey, Nagel und Co., Düren

*** Fa. LKB, Stockholm/Schweden

**** LKB Uvicord 4701A Ultraviolet-Absorptiometer

Substanzen (Proteine, Polysaccharide, Nucleinsäuren), welche UV-Licht der Wellenlänge 253mp absorbieren, da der Photostrom und damit der vom Schreibgerät registrierte Ausschlag proportional der Durchlässigkeit des kontinuierlich durch die Küvette fließenden Eluats ist. Als Zuleitungen von der Säule zur Küvette und von dieser zum Fraktionssammler fanden dünne PVC-Schläuche Verwendung. Bei einer Laufgeschwindigkeit des Registrierpapiers von 10mm/Std. wurden mit Hilfe eines Siphons 5ml-Fractionen aufgefangen. Durch Farbbandwechsel des Schreibgerätes nach jeweils 4 Röhrchen mit insgesamt 20ml konnten die, die Lichtdurchlässigkeit herabsetzenden Fractionen aufgefunden und herausgenommen werden.

a. Ionenaustauschchromatographie:

1. Austauscher und ihr Äquilibrieren:

Von den durch PETERSON und SOBER (17) eingeführten Ionenaustauschern auf Cellulose-Basis sollte als Anionenaustauscher DEAE-Cellulose*, als Kationenaustauscher CM-Cellulose** auf ihre Eignung geprüft werden. Die Bindung von Proteinen an Anionenaustauscher erfolgt im ionenarmen Milieu bei hohem pH-Wert, ihre Ablösung im ionenreicheren Milieu bei niedrigerem pH-Wert. Bei Verwendung von Kationenaustauschern ist gleichfalls im ionenarmen Milieu, aber bei niedrigem pH-Wert zu binden, während die Ablösung im ionenreicheren Milieu bei höherem pH-Wert erfolgt. Entsprechend diesen Grundsätzen wurde DEAE-Cellulose nach einem Vorschlag von BOMAN (2) mit 0,01M Tris-HCl-Puffer (pH 8,4) und CM-Cellulose mit 0,01M Natriumphosphat-Puffer (pH 5,6) aufgeschwemmt, ausgiebig entgast und danach in der Filternutsche unter Vakuum äquilibriert, bis der pH-Wert des abtropfenden Puffers demjenigen des Äquilibrierpuffers entsprach.

2. Packen der Säulen:

Die Äquilibrierte, mit Äquilibrierpuffer in eine gut

* Type DEAE-CM, Kapazität 0,83. Serva-Entwicklungslabor. Heidelberg

** Type CM, Kapazität 0,56. Serva.

gießbare Aufschwemmung gebrachte Cellulose konnte unter wiederholtem Aufrühren mit einem Glasstab gleichmäßig in ein vorbereitetes Chromatographierohr eingeschlemmt werden, so daß der Austauscher nach mehrstündigem Spülen mit Äquilibrierpuffer seine definitive Höhe einnahm.

3. Auftragen der Analysenlösung:

Mit einer 10mm über dem Ausfluß rechtwinklig abgebogenen Pipette ließ sich die durch Dialyse mit dem Äquilibrierpuffer ins Gleichgewicht gesetzte Analysenlösung nach Abheben des überstehenden Puffers ohne Zerstörung der Austauscheroberfläche auftragen. Sofort nach dem Eindringen der Probe wurde die Rohrwandung mit einigen ml Äquilibrierpuffer vorsichtig gespült, nach deren Bindringen das Rohr mit Äquilibrierpuffer aufgefüllt und der Schütteltrichter aufgesetzt.

4. Elution:

Der stufenweisen Elution dienten folgende Pufferlösungen: Für DEAE-Cellulose-Säulen Tris-HCl-Puffer nach GOMORI (5). Elutionspuffer mit steigender Konzentration und sinkendem pH-Wert ließen sich aus folgenden Stammlösungen mischen:

Stammlösung A: 24,2g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, in 1000ml aqua dest. gelöst, ergaben eine 0,2M Lösung.

Stammlösung B: 1N HCl.

Für CM-Cellulose-Säulen Natriumphosphatpuffer. Elutionspuffer mit steigender Konzentration und steigendem pH-Wert ließen sich aus folgenden Stammlösungen mischen:

Stammlösung A: 156,0g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, in 1000ml aqua dest. gelöst, ergaben eine 1M Lösung.

Stammlösung B: 178,0g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SÖRENSEN), in 2000ml aqua dest. gelöst, ergaben eine 0,5M Lösung.

b. Gel-Filtration:

1. Gele und ihre Bereitung:

Als Gele fanden Verwendung:

1) Peripolymerisiertes "ephadex*" (quervernetztes Dextran) der

Typen

G-100, G-150 und G-200.

- 2) Bio-Gel* (Copolymer aus Acrylamid und Methylenbis-acrylamid) des Typs P-300.

In aqua dest. oder 0,1M NaCl-Lösung aufgeschwemmtes Sephadex-Trockengel wurde ausgiebig unter Vakuum entgast, während 24 Std. zehnmal dekantiert und mit entgastem aqua dest. bzw. 0,1M NaCl-Lösung erneut suspendiert. Bio-Gel dagegen verklumpt beim Aufschwemmen sehr stark und ergibt keine homogene Suspension. Das Trockengel mußte deshalb durch ein Perlongewebe hindurch sehr langsam in gerührtes aqua dest. eingesiebt werden. Anschließend erfolgte das Entgasen unter Vakuum bei ständigem Rühren auf dem Magnetrührer.

Während 24-stündiger Quellzeit ließen sich durch zehnmaliges Dekantieren und Aufschwemmen kleinere Partikel entfernen.

2. Präparation der Säulen:

Die oben mit Schliff versehenen Glasrohre hatten einen inneren Durchmesser von 2,2cm, eine Länge von 55cm und daher ein Volumen von etwa 170ml für das Gelbett. Nach gründlicher Reinigung des Rohres wurde dasselbe mit entgastem aqua dest. oder 0,1M NaCl-Lösung gefüllt, und ein blasenfreier Siebboden im konisch ausgezogenen Ende mit Glaswolle und Glasperlen hergestellt. Das gequollene, in eine gut gießbare Suspension gebrachte Gel ließ sich unter Verwendung eines Rührmotors** gleichmäßig in das Rohr einfüllen. Dabei war es notwendig, den Säulenausfluß mittels Schlauch auf das vorgesehene Niveau der Gelbettoberfläche zu legen, um bei der Chromatographie eine ausreichende Elutionsgeschwindigkeit zu erzielen. Dies dauerte je nach Geltyp zwischen 6 und 8 Stunden. Nach Erreichen der vorgesehenen Gelbetthöhe wurde die Geloberfläche aufgerührt, ein mit Elutionsmittel gefüllter Schütteltrichter aufgesetzt und die Säule für kurze Zeit durchgespült.

* Calbiochem, 5000 Luzern/Schweiz.

** Laborrührer Type RZR. Fa.Heidolph Elektro KG, Kehlheim.

3. Auftragen der Analysenlösung:

Zum Auftragen der Analysenlösung fand die bereits beschriebene, rechtwinklig abgeboogene Pipette Verwendung, die es gestattete, die Lösung an der Rohrwandung wenige cm über dem Gel ablaufen zu lassen, ohne dabei die glatte Geloberfläche aufzuwirbeln. Ein Volumen von 5ml der zu reinigenden Analysenlösung wurde hiermit durch Unterschichten der überstehenden Flüssigkeit aufgetragen und der mit Elutionsmittel gefüllte Schütteltrichter aufgesetzt.

4. Elution:

Als Elutionsmittel dienten aqua dest. sowie 0,1M, 0,2M und 0,5M NaCl-Lösung. Der während der Chromatographie auf der Säule lastende hydrostatische Druck sollte demjenigen bei der Präparation entsprechen, weshalb die Säule so befestigt werden mußte, daß die Gelbetoberfläche auf das Niveau des Siphons zu liegen kam.

VI. Gewinnung von Immunseren:

Nach Sterilitätskontrolle des Homogenisats von *C. albicans* CBS 256 sowie der aus Zellinhaltsmaterial gewonnenen Fraktion wurden je zwei Kaninchen mit insgesamt 19ml nach folgendem Schema immunisiert: In der ersten Woche intravenöse Injektion von 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,0 ml an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Zwei Tage Pause. In der zweiten und dritten Woche 2,0ml an jedem zweiten Tag. Vier Tage nach der letzten Injektion wurden Blutproben aus der Chrvene entnommen, und die 10 Min. lang bei 3000UpM zentrifugierten Seren in sterilen Röhrchen bis zum Gebrauch eingefroren. Bei nicht ausreichender Antikörperbildung erfolgten weitere Antigengaben wie in der zweiten und dritten Woche.

VII. Immunoelektrophorese:

Die von GRABAR und WILLIAMS entwickelte und durch SCHEIDEGGER (18) als Mikromethode modifizierte Immunoelektro-

phorese wurde in der von der Fa. LKB, Stockholm/Schweden vertriebenen Apparatur durchgeführt. Für den benötigten 1,2%igen Agar wurden 1,2g Special Agar-Noble* in einer Mischung von 50ml aqua dest. und 50ml des unter Abschnitt IV.1. genannten Veronalpuffers 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Die auf entfettete, genau waagerecht liegende Objektträger mittels einer Pipette aufgetragene Agarlösung war nach 20 Min. erstarrt, so daß sich Graben und Zylinder mit dem LKB-Zusatzgerät** einstanzen ließen. Je ein Tropfen der Lösung, welche die elektrophoretisch aufzutrennenden Antigene enthielt, ließ sich mit einer Kapillare in die ausgehobenen zylinderförmigen Löcher einbringen. Anschließend wanderten die Antigene entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit 1 Std. lang bei 250 Volt im elektrischen Feld der Stärke 10 Volt/cm anodenwärts (linksseitig) oder kathodenwärts (rechtsseitig). Als Stromzuleitungen von den mit Veronalpuffer gefüllten Trögen zu den Agarplatten dienten dabei getränkte Filzstreifen.

Nach beendeter Elektrophorese wurden die ausgehobenen Gräben mit Immunserum gefüllt, und die Agarplatten in der feuchten Kammer 24-48 Std. bei 4°C aufbewahrt, wo sich Diffusion und Immunpräzipitation vollzogen.

Nach 12-stündigem Waschen der Agarplatten in physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur wurden sie mit Filterpapierstreifen bedeckt und an der Luft vollständig getrocknet. Kurzzeitiges Abspülen unter Leitungswasser befreite die Objektträger von Filterpapierresten. Die Darstellung der Präzipitatinen erfolgte durch 30 Min. langes Eintauchen der Objektträger in eine Amidoschwarz-Farblösung (7g Amidoschwarz 10B Merck, gelöst in 1000ml Methanol-Eisessig***) und nachfolgend stufenweise Entfärbung in Methanol-Eisessig. Die trockenen Präparate wurden in Wasser ausgewaschen und an der Luft getrocknet.

* Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan, USA.

** Gel Punch Type 6808A

*** 9 Teile Methanol + 1 Teil Eisessig

C. Ergebnisse:

I. Antigenisolierung:

a. Präparative Trägerelektrophorese:

Wie MÜLLER und HIRSCH (15) zeigten, trennt sich homogenisiertes Zellmaterial von *Candida albicans* und *tropicalis* in der Agarelektrophorese bei Veronalpuffer pH 8,2 in zwei unterschiedliche Substanzgruppen auf. Die zur Kathode wandernde Gruppe ließ sich mit Perjodsäure-Schiff'schem Reagens (PAS) intensiv anfärben, während die zur Anode wandernde Gruppe nur durch Amidoschwarzfärbung darzustellen war. Es schien daher zunächst der Versuch berechtigt, diese beiden Substanzgruppen im präparativen Maßstab elektrophoretisch voneinander zu trennen. Pufferlösung und Trägermaterialien, sowie methodische Einzelheiten sind unter Abschnitt B.IV. beschrieben. Frisch bereiteter Zellinhalt von *C. albicans* diente nach Dialyse gegen Veronalpuffer pH 8,2 als Analysenlösung. Wie die Immunelektrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* auswies, waren die Eluate der Anodenseite nach Einengen im Rotationsverdampfer bei 20°C, sowie nach Gefriertrocknung stets frei von serologisch aktiven Substanzen, die der Kathodenseite zeigten nur geringe Mengen serologischer Aktivität ohne Auftrennung in Einzelantigene.

b. Ionenaustauschchromatographie:

Da die präparative Trägerelektrophorese eine Trennung serologisch aktiver Substanzen nicht ermöglichte, wurde der Versuch unternommen, das Antigenmisch, wie unter Abschnitt 2.1.a beschrieben, an Ionenaustauschersäulen aufzutrennen. Als Analysenlösung fanden je 10ml des nativen, gegen den jeweiligen Äquilibrierpuffer dialysierten Zellinhalts Verwendung. Das Chromatogramm von DEAE-Zellulose-Säulen war bei steigender Molarität und sinkendem pH-Wert, wie die Abb.1 zeigt, einkipplig. Der einzige Gipfel erschien bereits während der Elution mit Äquilibrierpuffer der molaren Tris-Konzentration 0,01 bei pH 3,4.

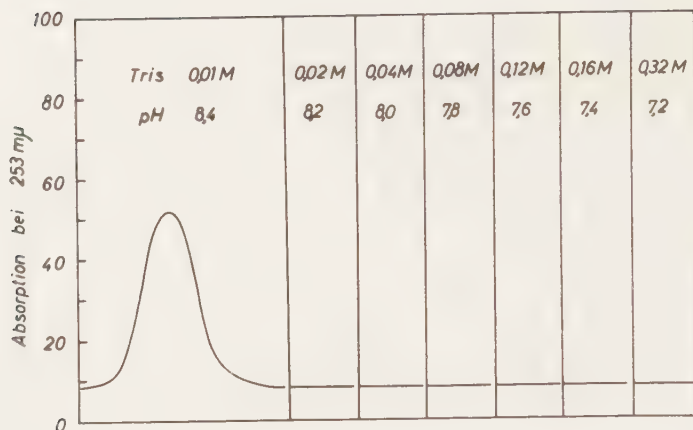


Abb.1 Bei 253mμ registrierte Absorptionskurve
des an DEAE-Cellulose chromatographierten
Zellinhalts von *C. albicans*.

Die Prüfung dieses, im Rotationsverdampfer bei 20°C eingedampften Gipfels in der Immunoelktrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* zeigte nur kathodenseitige Immunpräzipitationen, bei denen es sich, wie aus Abb.2 hervorgeht, um mindestens drei schalenförmig ineinanderliegende Linien handelt.



Abb.2 Immunoelktrophorese
Antigen: Aus Zellinhalt von *C. albicans*
an DEAE-Cellulose gewonnene Fraktion.
Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans*.

Chemisch waren Hexosen enthaltende Polysaccharide mit dem

Anthronreagens nachweisbar, die Biuretreaktion auf Proteine jedoch war negativ. Ebenso zeigte der negative Ausfall der Bial'schen Probe auf Pentosen Abwesenheit von Polynucleotiden an. Das Chromatogramm von CM-Cellulose-Säulen dagegen war bei steigender Molarität und steigendem pH-Wert, wie die Abb.3 zeigt, zwölfgipflig. Bei Elution mit dem zum Äquilibrieren verwendeten 0,01M Phosphatpuffer, pH 5,6, entstanden bereits sechs Gipfel.

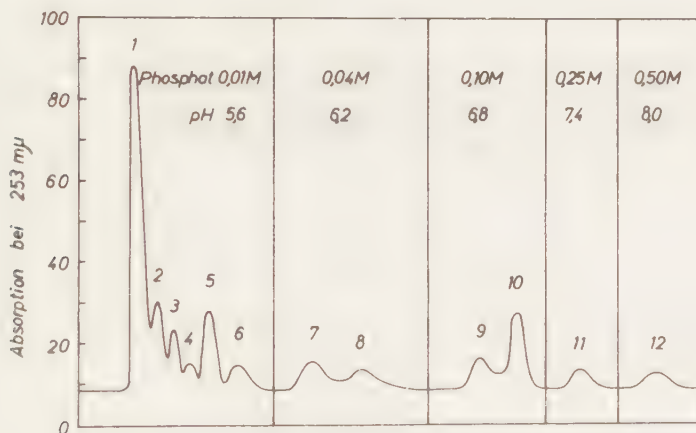


Abb.3 Bei 253mp registrierte Absorptionskurve
des an CM-Cellulose chromatographierten
Zellinhalts von *C. albicans*.

In vitro aktive Substanzen ließen sich nur in dem, mit Äquilibriumspuffer eluierten ersten und zweiten Gipfel nachweisen. Auch hier handelte es sich, wie Abb.4 und 5 zeigt, nur um kathodenwärts wandernde Antigene, wobei aber durch zonenformige Anordnung der Substanzen in der Reihenfolge ihrer Affinität zum Austauscher, also durch Frontanalyse, eine serologisch weitgehend einheitliche Substanz gewonnen werden konnte (Abb.5).



Abb.4 Immunoelktrophorese

Antigen: Aus Zellinhalt von *C. albicans*
an CM-Cellulose gewonnene 1.Fraktion.
Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans*.



Abb.5 Immunoelktrophorese

Antigen: Aus Zellinhalt von *C. albicans*
an CM-Cellulose gewonnene 2.Fraktion.
Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans*.

Von den chemischen Proben war in beiden Gipfeln nur die Anthronreaktion eindeutig positiv.

c. Fraktionierte Ammonsulfatfällung:

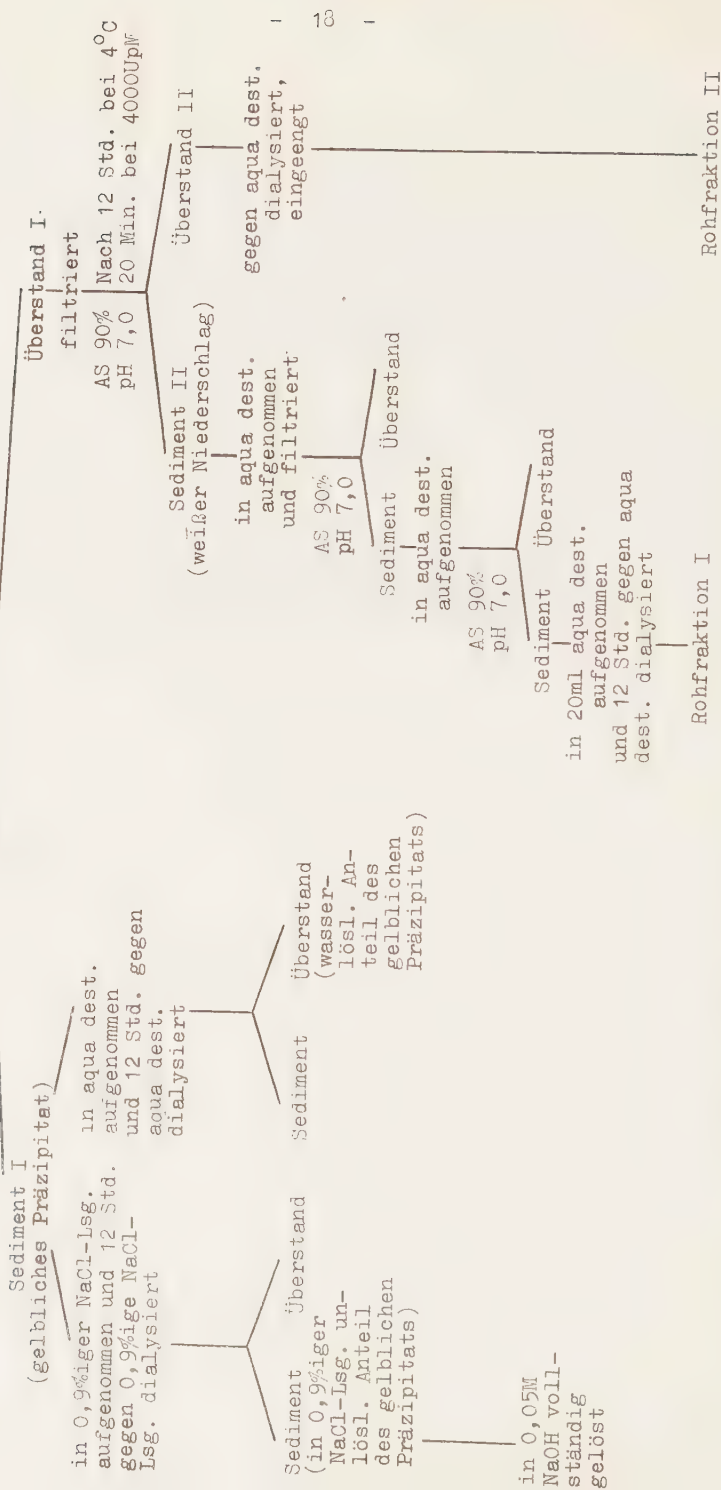
Die Auftrennung des Zellinhalts an CM-Cellulose in zwölf Fraktionen, von denen nur zwei in vitro aktive Substanzen von Polysaccharidcharakter enthielten, begründete die Vermutung, daß Proteoantigene des Zellinhalts durch den Mechanismus des Ionenaustauschs ihre serologische Aktivität verlieren. Da jedoch die zu isolierenden Antigene nicht nur ihre Reaktionsfähigkeit mit dem entsprechenden Antikörper in vitro, sondern darüber hinaus auch ihre Antikörperbildung induzierende Eigenschaft beibehalten sollen, so wurde zur Präparation nach schonenden, die Erhaltung der biologischen Aktivität garantierenden Fraktionierungsmethoden gesucht. Da ein Optimum an Reinheitsgrad meist nur durch Kombination mehrerer Verfahren zu

erreichen ist, welche nach unterschiedlichen Prinzipien arbeiten, wurde in Anlehnung an die im industriellen Maßstab betriebene Plasmaproteinauftrennung (9) zunächst mit einer fraktionierten Ammonsulfatfällung begonnen, wie sie auf Seite 18 schematisch dargestellt ist.

Aus jeweils 100ml frisch bereiteten Inhaltsmaterials von *C. albicans* CBS 256 ließ sich durch Zusatz des gleichen Volumens einer gesättigten wäßrigen Ammonsulfatlösung (50%ige Ammonsulfatsättigung) bei pH 7,0 innerhalb von 24 Std. bei 4°C ein gelbliches Präzipitat restlos ausfällen, welches durch 20 Min. lange Zentrifugation mit 4000UpM nahezu vollständig abzuschleudern war. In der Immunoelktrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* zeigte der wasserlösliche Anteil des gelblichen Präzipitats nur eine breite, verschwommene kathodenseitige Präzipitation und lediglich eine positive Anthronreaktion.

Zellinhalt

AS 50% Nach 24 Std. bei 4°C
pH 7,0 20 Min. bei 4000UpM



Schema der Rohfraktionierung durch Ammonsulfatfällung

Der in 0,9%iger Kochsalzlösung unlösliche Anteil war vollständig löslich in 0,05M Natronlauge und ergab eine positive Biuretprobe, jedoch keine Hitzekoagulation.

Aus dem filtrierten* Überstand nach 50%iger Ammonsulfatsättigung fiel durch Zusatz des 4-fachen Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung (90%ige Ammonsulfatsättigung) bei pH 7,0 im Verlauf von 12 Std. bei 4°C ein weißer Niederschlag aus, der 20 Min. lang mit 4000UpM abzentrifugiert werden konnte. Dieses Sediment war in aqua dest. fast vollständig löslich, Spuren unlöslicher Bestandteile wurden abfiltriert*. Die Fällung bei 90%iger Sättigung wurde zweimal wiederholt, das letzte Sediment in 20ml aqua dest. unter Entstehung einer stark opaleszierenden Lösung aufgenommen und 12 Std. bei 4°C gegen aqua dest. dialysiert. Die so gewonnene Rohfraktion I zeigte in der Immunoelktrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* mindestens drei anodenseitige Präzipitatlinien, eine kathodenseitige und eine unter dem Auftragspunkt gelegene Linie (Abb.7).



Abb.6



Abb.7



Abb.8

Immunoelktrophoresen mit Serum gegen Zellhomogenisat
von *C. albicans*.

Abb.6 Antigen: Zellhomogenisat von *C. albicans*.

Abb.7 Antigen: Rohfraktion I von *C. albicans*.

Abb.8 Antigen: Rohfraktion II von *C. albicans*.

* Filter Nr. 595, C. Schleicher und Schüll.

Die chemische Prüfung dieser Rohfraktion I ergab eine positive Biuret- und Anthronreaktion, während die Bialsche Probe negativ ausfiel. Bei Erhitzen der Lösung im siedenden Wasserbad trat Koagulation ein.

Der klare Überstand II (siehe Schema) wurde nach ausgiebiger Dialyse gegen aqua dest. und Einengen bei 20°C im Rotationsverdampfer auf 1/20 des Ausgangsvolumens erneut bei pH 7,0 mit Ammonsulfat 90%ig gesättigt. Während 24 Std. bei 4°C fiel kein Präzipitat mehr aus. Nach Dialyse gegen aqua dest. zeigte die im Rotationsverdampfer auf 10ml eingeengte Lösung (Rohfraktion II) in der Immunoelktrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* mindestens fünf, zum Teil schalenförmig ineinanderliegende kathodenseitige, aber keine anodenseitigen Immunpräzipitationen (Abb.8). Chemisch ergab diese Rohfraktion II eine stark positive Anthron-, aber negative Biuretreaktion.

Weitere Versuche mit Fällungen bei niedrigeren oder höheren pH-Werten sowie mit Ammonsulfatsättigungen zwischen 50 und 90% erbrachten auf keiner Stufe einen höheren immunologischen Reinheitsgrad und zeigten damit die Grenzen der Rohfraktionierung durch Salzfällung.

d. Gel-Filtration:

Dieses besondere chromatographische Verfahren, dessen Prinzip die Trennung von Substanzen nach Molekülgröße ist, sollte der weiteren Reinigung des Antigengemischs dienen, welche durch Salzfällung nur unzureichend möglich war.

Als Analysenlösung für die Gel-Filtration an perlpolymerisiertem Sephadex diente der native, gegen 0,1M NaCl-Lösung dialysierte Zellinhalt von *C. albicans*, sowie die durch Ammonsulfatfällung gewonnene Rohfraktion I. Im ersteren Falle erfolgte die Elution der mit 0,1M NaCl-Lösung ins Gleichgewicht gesetzten Säule mit 0,1M NaCl-Lösung, im letzteren mit aqua dest. Dabei stellte sich heraus, daß bei pH 8,2 anodenwärts wandernde, serologisch aktive Substanzen die Säule nur dann passieren und

im Eluat erscheinen, wenn ihr Molekulargewicht die Ausschlußgrenze des verwendeten Gels überschreitet, die Substanzen sich also im ersten Gipfel (Ausschlußgipfel) des Chromatogramms befinden. Nur unter dieser Bedingung ist überhaupt mit der Elution wenigstens eines geringen Teils solcher Substanzen von Sephadex-Säulen zu rechnen. Bei Chromatographie an Sephadex-Gel mit hoher Ausschlußgrenze, wie G-200, fanden sich, wie die Immunelektrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* auswies, im Ausschlußgipfel nie anodenseitig präzipitierende Antigene, wie es - jedoch mit nur geringem immunologischen Reinheitsgrad - bei Verwendung des Geltyps G-150 und G-100 der Fall war.

Da also im ionenarmen Milieu eine vollständige Adsorption eiweißartiger Substanzen offenbar dann auftritt, wenn diese das dreidimensionale Netzwerk der Dextranketten durchwandern, letzteres aber als Voraussetzung der beabsichtigten Isolierung anzusehen war, so wurde in Analogie zu den Erfahrungen von GLAZER und WELLNER (4) die Gel-Filtration an Sephadex G-200 und G-150 in 0,1 molarem Kochsalzmilieu bzw. mit aqua dest. eingeleitet, und die NaCl-Konzentration stufenweise bis 0,5M erhöht. Auch mit dieser Methode gelang es nicht, bei pH 8,2 anodenwärts wandernde Antigene zu eluieren. Dagegen erwies sich die Gel-Filtration an Sephadex als brauchbar für die Isolierung zur Kathodenseite wandernder Antigene, bei denen es sich chemisch - wie in Abschnitt C.I.a. dargelegt - um Polysaccharide oder Glykoproteine handelt. So ließ sich an Sephadex G-150 aus Rohfraktion I mit aqua dest. als Elutionsmittel eine antigene Substanz isolieren, die wie folgt charakterisiert ist:

- 1) Das Molekulargewicht liegt unter 150 000, da sie den zweiten Gipfel des Chromatogramms bildete.
- 2) Nach lyophiler Trocknung ist sie rasch in klare wäßrige Lösung zu bringen.
- 3) In der Immunelektrophoretischen Reinheitsprüfung wird sie, wie Abb.11 zeigt, kathodenseitig präzipitiert.

- 4) Nach dreimaligem Erhitzen auf 60°C für die Dauer von jeweils 1 Std. zeigt sie keinen Verlust serologischer Aktivität *in vitro*.
- 5) Sie ergibt eine positive Anthron- und Biuretreaktion und enthält nach Säurehydrolyse dem papierchromatographischen Nachweis zufolge Glukose und Mannose sowie mehrere Aminosäuren.
- 6) Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 280mp.

Das Scheitern der Wiedergewinnung bei pH 8,2 anodenwärts wandernder Proteoantigene an Sephadex führte zur Testung von Bio-Gel auf seine Verwendbarkeit.

Die als Analysenlösung aufgetragene Rohfraktion I ließ sich von Bio-Gel P-300-Säulen mit aqua dest. stets reproduzierbar als dreigipfliges Chromatogramm eluieren (Abb.9).

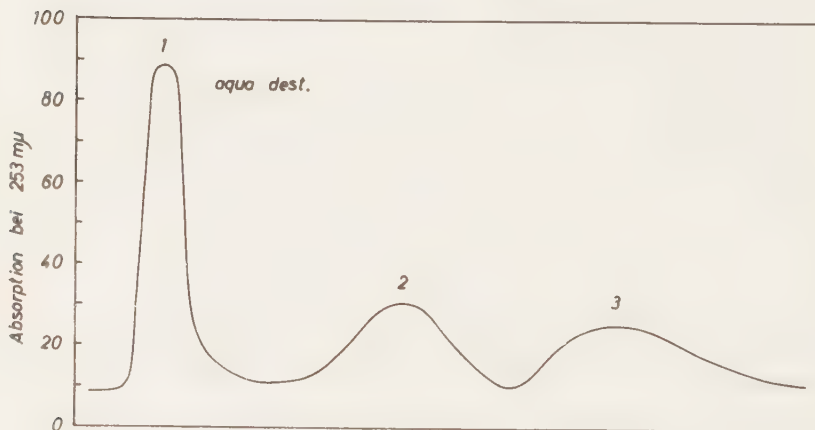


Abb.9 Bei 253mp registrierte Absorptionskurve
der an Bio-Gel P-300 chromatographierten
Rohfraktion I von *C. albicans*.

Die den drei Gipfeln entsprechenden Eluate wurden bei 20°C im Rotationsverdampfer auf je 1ml eingengt. Die danach stark opaleszente erste Fraktion (Ausschlußfraktion), die Substanzen

mit einem Molekulargewicht über 300 000 enthält, zeigte in der Immunoelktrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* keine Immunpräzipitationen, ergab eine positive Anthron-, aber negative Biuretreaktion und enthielt nach Säurehydrolyse, wie das Papierchromatogramm auswies, nur Glukose.

Die völlig klare zweite Fraktion wurde in der Immunoelktrophorese durch mehrere, gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* gerichtete Seren in Form einer weit anodenwärts, sowie einer am Auftragspunkt gelegenen Linie präzipitiert (Abb. 12) und ließ die Anthron- und Biuretreaktion positiv ausfallen.

Im Gegensatz zu dem elektrophoretisch unbeweglichen, erwies sich das weit anodenwärts gewanderte Antigen als hitzelabil: es wurde nach einstündigem Erwärmen auf 60°C durch Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* nicht mehr präzipitiert.



Abb.10



Abb.11



Abb.12

Immunoelktrophoresen mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans*.

Abb.10 Antigen: Rohfraktion I von *C. albicans*.
(wie Abb. 7)

Abb.11 Antigen: Aus Rohfraktion I von *C.albicans*
an Sephadex G-150 gewonnene 2.Fraktion.

Abb.12 Antigen: Aus Rohfraktion I von *C. albicans*
an Bio-Gel P-300 gewonnene 2.Fraktion.

In der dritten chromatographischen Fraktion fanden sich, wie die Immunoelektrophorese mit Serum gegen Zellhomogenisat von *C. albicans* auswies, nur Anteile der kathodenwärts wandernden Polysaccharide wieder.

Die auf Bio-Gel-Säulen vom Typ P-300 als Analysenlösung aufgetragene Rohfraktion II (siehe Schema) erschien mit Ausnahme der elektrophoretisch weniger beweglichen Anteile im Ausschluß, welcher nur Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 300 000 beinhaltet. Eine deutliche Absorptionsschreibung während der Chromatographie jedoch mäßig, da die in Rohfraktion II enthaltenen Substanzen von Polysaccharidcharakter im UV-Spektrum bei 260m μ ein Minimum aufweisen.

II. Gewinnung von Immunsereen:

Da die durch fraktionierte Ammonsulfatfällung und nachfolgende Gel-Filtration an Bio-Gel P-300 als zweiter Gipfel gewonnene Fraktion mit dem anodenwärts wandernden Antigen eine hitzelabile Substanz enthielt, so mußte zur Sterilisation auf Autoklavieren und Tyndallisieren verzichtet werden. Das den Sammelgläschen entnommene, dem zweiten Gipfel entsprechende Eluat wurde daher zunächst unter Vakuum durch ein Ganzglas-Bakterienfilter* vom Typ 5f filtriert, das die Abtrennung von Mikroorganismen mit einem Durchmesser von 1 μ und darüber ermöglicht.

Im Rotationsverdampfer wurde das Filtrat anschließend unter sterilen Bedingungen bei 20°C mit eiswassergekühltem Auffanggefäß auf 5 ml eingengt und mit steriler 20%iger Kochsalzlösung verdünnt. Nachdem ein Ausstrich auf Blutagar die Sterilität

* Fa.Schott u.Gen., Mainz.

der Probe ergeben hatte, erhielten zwei Kaninchen je 19ml dieser Antigenlösung nach dem unter Abschnitt B.VI. beschriebenen Modus intravenös injiziert.

Das erhaltene Serum präzipitierte in der Immunoelktrophorese aus Zellhomogenisat von *C. albicans* beide Antigene, die in der an Bio-Gel P-300 gewonnenen zweiten Fraktion vorhanden waren (Abb.13)



Abb.13 Immunoelktrophorese

Antigen: Zellhomogenisat von *C. albicans*.

Serum gegen die aus Rohfraktion I von *C. albicans* an Bio-Gel P-300 gewonnene 2.Fraktion.

III. Immunoelktrophoretische Kreuzreaktionen:

Von den unter Abschnitt B.I. aufgeführten Hefestämmen wurden zunächst, wie beschrieben, Zellhomogenisate hergestellt. Diese wurden in der Immunoelktrophorese mit Serum gegen die aus Rohfraktion I von *C. albicans* an Bio-Gel P-300 gewonnene zweite Fraktion geprüft. Außer *C. albicans* A und B, deren immunoelktrophoretische Bilder der Abb.13 glichen, zeigten nur *C. tropicalis* und *C. stellatoidea* Präzipitatlinien, welche aus Abb.14 und 15 ersichtlich sind. Danach haben *C. tropicalis* das bei pH 8,2 elektrophoretisch unbewegliche, hitzestabile sowie *C. stellatoidea* zusätzlich das weit anodenwärts wandernde, hitzelabile Antigen mit *C. albicans* gemeinsam.



Abb.14



Abb.15

Immunoelektrophoretische Kreuzreaktionen mit Serum gegen die aus Rohfraktion I von *C. albicans* an Bio-Gel P-300 gewonnene 2.Fraktion.

Abb. 14 Antigen: Zellhomogenisat von *C. tropicalis*

Abb. 15 Antigen: Zellhomogenisat von *C. stellatoidea*

Eine der Abb. 14 gleichende immunoelektrophoretische Kreuzreaktion entstand bei Verwendung der Rohfraktion I von *C. tropicalis* als Antigen. Die übrigen verwendeten Hefestämme zeigten im Hinblick auf diese beiden antigenen Substanzen keinerlei Kreuzverwandtschaft mit *C. albicans*.

D. Besprechung:

Bei weitgehender Auftrennung des Antigengemischs (Zellinhalt von *Candida albicans* und *tropicalis*) in der Agarelektrophorese, mißlangen jedoch die zur Präparation in der Hochspannungselektrophorese durchgeführten Versuche. Da die an Abklatschstreifen durchgeführten Nanhydrin-Sprühteste auf der Anodenseite stets negativ, am Auftragsgraben dagegen deutlich positiv waren, liegt die Vermutung nahe, daß eine Wanderung von Proteoantigenen der starken Trägeradsorption zufolge nicht stattfand. Diese Annahme wurde gestützt durch Beobachtung des gleichen Phänomens während der Gel-Filtration an Sephadex-Säulen, bei der es gleichfalls zur vollständigen Adsorption anodenwärts wandernder Antigene kam. Obgleich eine Reihe von Eiweißkörpern den Mechanismus des Ionenaustauschs ohne Verlust ihrer serologischen Aktivität überstehen, ließ sich ein solches Verhalten von Proteoantigenen aus dem Zellinhalt von *Candida albicans* nicht nachweisen und daher für ihre Trennung an Austausch-Cellulose auch nicht ausnutzen. Die an DEAE-Cellulose durchgeführte Chromatographie (Abb.1), bei der nur alkalische pH-Werte benutzt wurden, stützt dabei die Annahme, daß es der Mechanismus des Ionenaustauschs allein, nicht aber ein denaturierender Effekt seitens eines saueren Milieus ist, der den Verlust serologischer Aktivität herbeiführt. Bei den Gipfeln 3 bis 12 des CM-Cellulose-Chromatogramms (Abb.3) dürfte es sich kaum um durch Eiweißkörper hervorgerufene Lichtabsorptionen handeln, da die Biuretreaktion stets negativ ausfiel. Die im Zellinhalt sowohl serologisch wie chemisch nachweisbaren Proteine ließen sich also nach der Bindung an die aktiven Gruppen der Cellulose offenbar nicht mehr ablösen, oder waren nach der Ablösung infolge Ausfällung nicht mehr eluierbar. Die durch fraktionierte Ammonsulfatfällung gewonnenen Fraktionen scheinen mit den bekannten definierten Hefeproteinen übereinzustimmen. Bei diesen handelt es sich erstens um Cerevisin, ein wasserlösliches, nichtkoagulierbares Protein von Globulincharakter, sowie zweitens um Zymocasein, ein wasserunlösliches, nur alkali-

lösliches, nicht hitzecoagulierbares gelbes Phosphoprotein. Außerdem sind wasserunlösliche, in verdünnten Neutralsalzlösungen lösliche, hitzecoagulierbare Proteine von Globulincharakter bekannt. Das bei 50%iger Ammonsulfatsättigung und pH 7,0 ausfallende Sediment I enthält neben Proteinen von Globulincharakter offenbar das nur alkalilösliche, gelbe Zymocasein. Die übrigen im Zellinhalt vorhandenen Proteine werden, wie die Proteinfreiheit von Überstand II zeigt, bei 90%iger Ammonsulfatsättigung restlos ausgefällt und haben, soweit sie als wasserlösliche Anteile in Rohfraktion I enthalten sind, die für Cerevisin genannten Eigenschaften. Die Auftrennung in drei anodenwärts wandernde Antigene der Rohfraktion I, die aus Abb. 7 ersichtlich sind, legt die Vermutung nahe, daß das Cerevisin immunologisch als uneinheitlich anzusehen ist. Die Immunisierung mit der an Bio-Gel P-300 gereinigten Rohfraktion I von *C. albicans* führte zur Bildung von zwei Antikörpern. Beide Antikörper reagieren außer mit dem Homogenisat von *C. albicans* 256 aus dem CBS Delft mit den nach HASENCLEVER (8) benannten Typen A und B von *C. albicans* sowie mit *C. stellatoidea*. Mit dem Homogenisat von *C. tropicalis* reagierte nur einer der Antikörper. Alle anderen verwendeten Sproßpilze zeigten mit diesem Serum keine Reaktion. Wie MÜLLER und KRANTENBERG (16) zeigten, verbleiben nach Ausfällung des größten Teils der Zellinhaltsantigene von *C. albicans* mit Universalpuffer nach JOHNSON und LINDSAY bei pH 3,9 zwei Antigene im Überstand. Bei dem ersten dieser beiden Antigene handelt es sich der Position nach um das am weitesten anodenwärts wandernde Antigen (vgl. Abb. 12), bei dem zweiten um ein am Auftragspunkt gelegenes Antigen. Letzteres scheint mit dem an Bio-Gel P-300 gewonnenen und aus Abb. 12 ersichtlichen Antigen nicht identisch zu sein, da sein korrespondierender Antikörper zwar ebenfalls mit Zellhomogenisat von *C. tropicalis* (vgl. Abb. 14), nicht aber mit Zellhomogenisat von *C. stellatoidea* reagierte (vgl. Abb. 15). Mit der fraktionierten Ammonsulfatfällung ist ein Weg gefunden, aus der Vielzahl der Antigene einige zu isolieren. Bei Anwendung dieser Methode auf die übrigen Sproßpilze besteht die Möglichkeit, zu einem Antigenschema der Eiweißantigene zu kommen.

E. Zusammenfassung:

Aus dem Zellinhalt von *Candida albicans* sollten durch Präparation mit verschiedenen Methoden Antigene isoliert werden.

Eine Trennung von Eiweißantigenen aus dem Zellinhalt von *C. albicans* in der präparativen Hochspannungselektrophorese war der starken Trägeradsorption zufolge nicht erreichbar. Von Ionenaustauschern auf Cellulose-Basis ließen sich zwar keine Eiweißantigene, jedoch Antigene von Polysaccharidstruktur eluieren. Eines dieser Antigene wurde durch den Effekt der Fröntanalyse an CM-Cellulose immunologisch weitgehend gereinigt.

Stufenweise Falfällung mit Ammonsulfat führte zu Fraktionen, die mit definierten Hefeproteinen verglichen wurden.

Fraktionierte Ammonsulfatfällung und nachfolgende Gel-Filtration an Bio-Gel F-300 ermöglichte die Abtrennung von zwei wasserlöslichen Antigenen. Das erste, dem Cerevisin nahestehende Antigen, wandert am weitesten anodenwärts und ist ebenfalls in *C. stellatoidea* nachweisbar. Das zweite, ein bei pH 8,2 elektrophoretisch unbewegliches Antigen von Polysaccharid- bzw. Glykoproteincharakter, ist sowohl in *C. stellatoidea* als auch in *C. tropicalis* nachweisbar.

Ein weiteres, immunologisch einheitliches Glykoprotein aus dem Zellinhalt von *C. albicans* ließ sich durch Gel-Filtration an Sephadex G-150 gewinnen. Seine physikalisch-chemischen Eigenschaften wurden geprüft.

F. Literaturverzeichnis

- 1) BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S. et FRUIT, J., Analyse immunoélectrophorétique des antigènes fongiques et systématique des champignons. Répercussions partiques sur le diagnostic des mycosis. Mycopathol. et Mycol. appl. 26, 241 - 256 (1965).
- 2) BOMAN, H.G. and WESTLUND, L.E., Protein Chromatography on an Anion-Exchange Resin. Arch. Biochem. Biophysics 64, 217 - 239 (1956).
- 3) GÄUMANN, E., Die Pilze. Birkhäuser, Basel (1949).
- 4) GLAZER, A.N. and WELLNER, D., Adsorption of proteins on Sephadex. Nature 194, 862 - 863 (1962).
- 5) GQMORI, G., in: COLOWICK and KAPLAN, Methods in Enzymology, Bd. I, Academic Press, New York (1955).
- 6) GUILLIERMOND, A. and TANNER, F.W., The Yeasts. John Wiley and sons, inc., New York (1920).
- 7) HANSEN, E.C., Gesammelte theoretische Abhandlungen über Gärungsorganismen, Verlag G.Fischer, Jena (1911).
- 8) HASENCLEVER, H.F. and MITCHELL, W.O., Antigenic studies of Candida. I. Observation of two antigenic groups in Candida albicans. J. Bact. 82, 570 - 574 (1961).
- 9) HEIDE, K. und HAUPT, H., Darstellung noch nicht therapeutisch angewandter Plasmaproteine. Behringwerk - Mitteilungen 43, 161 - 193 (1964).
- 10) JANKE, A., Allgemeine technische Mikrobiologie, 1. Teil: Die Mikroorganismen. Steinkopff - Verlag, Dresden, Leipzig (1924).
- 11) JÖRGENSEN, A., Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. 6. Auflage von HANSEN und LUND. Verlag G.Fischer, Jena (1940).
- 12) KLUYVER, A.J., VAN DER WALT, J.P. and VAN TRIET, A.J., Pulcherrimin, the pigment of Candida pulcherrima. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 39, 583 - 593 (1953).
- 13) LODDER, J. and KREGER-VAN RIJ, N.J.W., The yeasts. North-Holland Pub. Co. Amsterdam (1952).

- 14) MÜLLER, H.-L. und BÜRGER, H., Antigenanalyse von *Candida albicans* und *tropicalis*.
Zbl. Bakt. I. Orig. 198, 240 - 242 (1965).
- 15) MÜLLER, H.-L. und HIRSCH, M., Zur Antigenstruktur von *Candida albicans* und *tropicalis*. IV. Mitteilung: Immunelektrophoretische Antigenstudien an Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I. Orig. 202, 247 - 256 (1967).
- 16) MÜLLER, H.-L. und KRANENBERG, K., Untersuchungen über Antigengemeinschaften zwischen hefeartigen Pilzen.
Mycopathol. et Mycol. appl. (im Druck).
- 17) PETERSON, E.A. and SOBER, H.A., Chromatography of proteins. I. Cellulose/ ionexchange adsorbents.
J. Amer.Chem. Soc. 78, 751 - 755 (1956).
- 18) SCHULDEGGER, F.J., Une micro-méthode de l'immunoélectrophorese.
Int. Arch. Allergy 7, 103 - 110 (1955).
- 19) SIEGERT, R., MÜLLER, H.-L. und PACHALY, D., Zur Antigenstruktur von *Candida albicans* und *tropicalis*. I. Mitteilung: Antigene Eigenschaften von Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I. Orig. 191, 533 - 542 (1964).
- 20) SKINNER, C.E., The yeastlike fungi *Candida* and *Brettanomyces*.
Bacteriol. Rev. 11, 227 - 274 (1947).
- 21) TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y. and KAWAKITA, S., Significance of serological studies on yeasts.
Mycopathol. et Mycol. appl. 26, 1 - 15 (1965).
- 22) WICKERHAM, L.J., Taxonomy of Yeasts.
Technical Bulletin Nr. 1029. Dep. of Agriculture, Washington D.C. (1951).
- 23) WINDISCH, S., Die hefeartigen Pilze, in: Die Hefen. Band I. Die Hefen in der Wissenschaft. Verlag Hans Carl, Nürnberg (1960).

Herrn Professor Dr.med. R. Siegert, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Marburg (Lahn), danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die uneingeschränkte Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Gleichfalls bin ich Frau Dr.med. H.-L. Müller wegen ihrer ständigen Hilfsbereitschaft und freundlichen Beratung bei der Durchführung der Versuche zu herzlichem Dank verpflichtet.

Besonderen Dank schulde ich der "Stiftung Volkswagenwerk", durch deren Stipendium es mir möglich war, mich ganz der Promotionsarbeit zu widmen, ohne in das Berufsleben eintreten zu müssen.

Lebenslauf

Als fünftes Kind des Arztes Dr. Reinhard Stolzenbach und seiner Ehefrau Edith, geb. Joka, wurde ich am 2.5.1938 in Hamburg geboren.

Am 7.3.1959 legte ich am Gymnasium Bad Sooden-Allendorf die Reifeprüfung ab und immatrikulierte mich im Sommer-Semester 1959 an der Universität Göttingen, wo ich am 29.4.1960 die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand. Zum Sommer-Semester 1960 wechselte ich auf die Universität Marburg (Lahn) über und beendete dort am 30.10.1961 mit der ärztlichen Vorprüfung das vorklinische Studium. Die ärztliche Prüfung bestand ich an der Universität Marburg (Lahn) am 14.10.1965.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

in Göttingen: Birukow, Blechschmidt, Brockmann, Glemser,
 Graumann, Hilsch, Pirson;

in Marburg (Lahn): Amon, Beckmann, Berendes, Bock, Braun-Falco,
 Bücher, Dittrich, Exner, Gedigk, Golenhofen,
 Gross, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser,
 Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Lang,
 Linneweh, Lübbers, du Mesnil de Rochemont,
 Müller, Neubauer, Niessing, Nieth, Oehme,
 Oksche, Petry, Sauer, Schleyer, Schmid,
 Schölmerich, Schwaiger, Siegert, Siess,
 Stein, Straub, Streicher, Wendt, Würterle.

